Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Quantitative biologische Histaminbestimmung unter Verwendung eines Säulenchromatographischen Verfahrens

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg 1964

Vorgelegt von:
Martin Schulz
Sulzdorf/Grabfeld

D 29

1962 No 476

Dekan: Prof. Dr. G. Theissing

Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 1964

Int. Arch. Allergy *23:* 157–166 (1963).

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Quantitative biologische Histaminbestimmung unter Verwendung eines säulenchromatographischen Verfahrens*

Von H. Warnatz, F. Scheiffarth und M. Schulz

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Bei der Wahl der Methodik zur quantitativen Histaminbestimmung muß davon ausgegangen werden, daß die meisten Untersuchungsmaterialien neben Histamin größere Mengen anderer Substanzen enthalten, die die Ergebnisse der biologischen Histaminbestimmung am Meerschweinchendarm beeinflussen. Der Meerschweinchendarm, der wegen seiner großen Empfindlichkeit im allgemeinen zur Histaminbestimmung benutzt wird, spricht neben Histamin auch auf andere biogene Amine, vor allem auf Serotonin und Acetylcholin sowie auf Bradykinin an (1, 6, 15, 19). In Vorversuchen konnte z. B. nachgewiesen werden, daß die Empfindlichkeit des Meerschweinchendarms für Serotonin stärkeren Schwankungen unterliegt. Gelegentlich können nach Serotoningaben sogar größere Zuckungen beobachtet werden als nach vergleichbaren Histaminmengen (umgerechnet auf die freie Base). Werden beide Amine gleichzeitig dem Meerschweinchendarm angeboten, so kommt es zu einer Addition der Wirkungen (19). Auf diese Weise werden bei quantitativen Histaminbestimmungen ohne vorherige Isolierung des Histamins zu hohe Werte gefunden. Es ist deshalb für eine exakte Histaminbestimmung notwendig, daß vor dem biologischen Versuch eine einwandfreie Trennung vom Serotonin erfolgt. Bei unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß dieses Ziel mit der von McIntire entwickelten Methode (11) allein nicht erreicht werden kann. Der nach McIntire gewonnene Extrakt ent-

* Herrn Prof. Dr. G. Hesse (Direktor des Institutes für organische Chemie, Erlangen) sei an dieser Stelle für seine wertvollen Ratschläge und Hinweise herzlichst gedankt.

hält wechselnde Mengen von Serotonin (zwischen 20 und 50% des ursprünglichen Serotoningehaltes, abhängig davon, wie lange das Untersuchungsmaterial einem alkalischen pH ausgesetzt ist). Wir haben deshalb eine Methode entwickelt, die eine exakte Trennung des Histamins von anderen biogenen Aminen und damit zugleich eine einwandfreie Messung des Histamingehaltes gewährleistet. Im Prinzip bedienten wir uns eines säulenchromatographischen Verfahrens zur Trennung; die quantitative Bestimmung führten wir am Meerschweinchendarm aus. Es handelt sich also um ein kombiniertes biologisch-chemisches Verfahren.

Methodik

Als Untersuchungsmaterialien kommen sämtliche Substanzen in Frage, bei denen eine Histaminbestimmung vorgenommen werden soll und das gleichzeitige Vorkommen von anderen biogenen Aminen zu erwarten ist. Während eiweißarme Lösungen direkt auf die Chromatographiesäule zwecks Trennung aufgetragen werden können, muß bei eiweißreichen biologischen Substanzen wie Serum, Plasma, Geweben usw., zunächst eine Extraktion der Amine vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wird nach Homogenisierung des Materials bzw. Zerstörung der Zellen das Verfahren nach McIntire (11) angewendet. Bei dieser Methode wird Histamin in alkalischem Milieu mit n-Butanol aus dem Untersuchungsmaterial ausgeschüttelt, an einen Kationenaustauscher, nämlich mit Bernsteinsäure veresterte Baumwolle, adsorbiert und aus diesem mit verdünnter Salzsäure eluiert.

Dazu werden z. B. 2 ml Plasma im Schliffreagenzglas mit physiologischer Kochsalzlösung auf 4,5 ml aufgefüllt und mit 1,2 g eines Salzgemisches, bestehend aus 6,25 g wasserfreiem Na_2SO_4 und 1 g $Na_3PO_4 \cdot 1\ H_2O$, versetzt. Je nach Eiweißreichtum und Menge des Untersuchungsmaterials muß die Menge der zur Verdünnung hinzugefügten physiologischen Kochsalzlösung und des Salzgemisches variiert werden. Um eine zufriedenstellende Histaminextraktion zu erreichen, muß die Menge des Salzgemisches genügen, die wäßrige Lösung auf ein pH von 12–13 zu bringen. Nach sorgfältigem Umschütteln werden zu jeder Probe 5 ml n-Butanol hinzugefügt. Das sich bildende Eiweißgel wird durch heftiges Schütteln zerschlagen. Anschließend werden die Reagenzgläser 20 min lang intensiv geschüttelt. Die vermischten Phasen werden durch Zentrifugieren bei 2000 U/min getrennt und das überstehende Butanol wird abgehebert. In Spezialröhrchen läßt man das Butanol durch mit Bernsteinsäure veresterte Baumwolle hindurchtropfen. Zur besseren Ausbeute wird die Ausschüttelung der wäßrigen Phase mit einer zweiten Menge von 5 ml Butanol wiederholt. Nach Auswaschen der Butanolreste aus dem Baumwollester mit 3 ml abs. Alkohol und 3 ml Aqua dest., wird das Histamin durch 1 ml einer 0,4 n Salzsäure. gefolgt von 1 ml Aqua dest., aus dem Baumwollester freigesetzt und das Eluat mit 0,5 ml einer 0,8 n Natronlauge neutralisiert.

Das in dem Eluat vorliegende Gemisch biogener Amine wird nun mit Hilfe der Säulenchromatographie getrennt. Hierzu wird der zur Trennung basischer Aminosäuren besonders geeignete Ionenaustauscher Amberlite IRC 50 verwendet (7).

Eine Säulenlänge von 14 cm bei einem Durchmesser von 0,6 cm ergibt eine genügend scharfe Trennung der in Frage kommenden Substanzen. Das eigentliche Chromatographierohr ist von einem Heizmantel umgeben, in dem Wasser der konstanten Temperatur von 40° C zirkuliert. Als Durchströmungsflüssigkeit für die Säule dient ein 0,2 m Natriumcitratpuffer des pH 7,5 (Zusammensetzung 121,5 g NaOH + 210 g Citronensäure + 5 l Aqua dest. Die Pufferlösung wird durch Aufkochen luftfrei gemacht und noch heiß mit einer Paraffinschicht überdeckt. Kühl und lichtgeschützt aufbewahrt, ist sie längere Zeit haltbar). Durch Verwendung einer mit einem Synchronmotor angetriebenen Glasspritze wird eine gleichmäßige Elutionsgeschwindigkeit von 30 ml/h erzielt. Das Amberlite wird nach Waschen mit 40%iger Natronlauge und 3 n Salzsäure mit Puffer auf pH 7,5 gebracht und in die Säule eingeschlemmt.

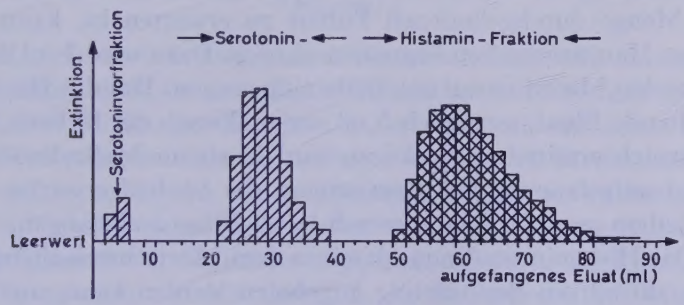

Abb. 1 zeigt die Lage der Histamin- und Serotoninfraktion in Abhängigkeit von der durch die Säule hindurchgelaufenen Puffermenge. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion des mit Hilfe eines Fraktionsschneiders getrennt in 2 ml Portionen aufgefangenen und mit Ninhydrinreagenz angefärbten Eluats mittels eines Spektralphotometers. Aus der Darstellung geht hervor, daß die Serotoninfraktion wesentlich rascher eluiert wird als die Histaminfraktion. Die Fraktionen sind gut voneinander getrennt. Insbesondere bei der Histaminfraktion wird das «tailing» deutlich, das nach der Probesäule ein längeres Nachwaschen der Säule mit Puffer vor Beginn der Hauptversuche erforderlich macht.

Bevor mit den Hauptversuchen begonnen werden kann, muß in einem Vorversuch bestimmt werden, nach welcher Menge durchgelaufenen Puffers die Histaminfraktion im Eluat auftritt. Dazu trägt man ein Gemisch von 1 mg Histamin und Serotonin auf die Säule auf. Nach Einsickern der aufgetragenen Lösung und zweimaligem Nachspülen mit Puffer wird das Säulenrohr mit Puffer aufgefüllt und luftblasenfrei die Verbindung mit der Spritze hergestellt. Das aus der Säule austretende Eluat wird durch einen Fraktionsschneider in gleich große Portionen aufgeteilt, die mit Ninhydrinreagens (9) versetzt werden (0,2%ige Lösung von Ninhydrin in Isopropanol, das 20% Pyridin enthält). Nach 15minütiger Inkubation im kochenden Wasserbad läßt sich an Hand der eintretenden Farbreaktion die Lage der violetten Histaminfraktion und ihr Abstand von der bräunlich gefärbten Serotoninfraktion feststellen. Unter den von uns eingehaltenen Be-

dingungen ist das Histamin in dem Eluat zwischen 50 und 80 ml nach Auftragung zu erwarten. Die Serotoninfraktion erscheint unter den gleichen Bedingungen wesentlich früher zwischen 21 und 38 ml. Bei photometrischer Auswertung ergibt sich die in Abb. 1 wiedergegebene Verteilung. Der Abstand der beiden Fraktionen soll zur Sicherheit mindestens 10 ml Eluat betragen. Acetylcholin und Bradykinin halten einen weit größeren Abstand von der Histaminfraktion ein, weshalb sich eine Kontrolle erübrigt. Das Acetylcholin (Sichtbarmachen der Fraktion mit Dragendorffs Reagens, (9) läuft unter den angegebenen Bedingungen, ohne festgehalten zu werden, durch die Säule hindurch. Das Bradykinin wird erst nach mehr als 100 ml aus der Säule eluiert.

Wie Untersuchungen am Meerschweinchen ergeben haben, ist auch in dem nachfolgenden Eluat jenseits der färbbaren Histaminfraktion noch mit langsam absinkenden Histaminkonzentrationen zu rechnen. Vor den Hauptversuchen, bei denen nur γ-Mengen von Histamin zur Anwendung gelangen, müssen daher zur Erzielung eines möglichst niedrigen und konstanten Säulenleerwertes nach der Orientierungssäule ca. 300 ml Puffer durch die Säule hindurchgeschickt werden.

Nach Feststellung der Lage der Histaminfraktion, die bei exakter Einhaltung der angegebenen Bedingungen immer nach der gleichen Menge durchgelaufenen Puffers zu erwarten ist, kann nun mit den Hauptversuchen begonnen werden. Dazu wird 1 ml des zu trennenden Materials auf die Säule aufgetragen. Das das Histamin enthaltende Eluat, zuzüglich 5 ml vor und nach der färberisch im Vorversuch ermittelten Fraktion, wird in einem Meßzylinder gesondert aufgefangen. Zur Bestimmung des Säulenleerwertes wird nach jedem zweiten Hauptversuch leeres Eluat aufgefangen.

Das Histamin muß nun, damit es dem Meerschweinchendarm zur quantitativen Bestimmung angeboten werden kann, aus dem Natriumcitratpuffer zurückgewonnen und in ein physiologisches Lösungsmittel übergeführt werden. Zu diesem Zwecke wird erneut das Verfahren nach McIntire angewandt.

Das Säuleneluat wird nach Zusatz von 2,5 g des oben genannten Salzgemisches pro 15 ml Puffer zweimal mit je 10 ml n-Butanol 30 min lang ausgeschüttelt. Die Butanolphase wird von der wäßrigen Phase im Scheidetrichter getrennt. Wasserreste werden abzentrifugiert. Anschließend wird das Butanol zur Adsorption des Histamins auf die McIntireschen Chromatographieröhren aufgetragen. In gleicher Weise, wie oben, wird nach Waschen mit absolutem Alkohol und Aqua dest. das Histamin mit Salzsäure unter Nachspülung eluiert. Nach Neutralisation des Eluates mit Natronlauge liegt das Histamin in physiologischer Kochsalzlösung vor.

Die quantitative Bestimmung des Histamins erfolgt schließlich am Meerschweinchendarm (2).

Dazu wird ein 2,5 cm langes Stück des unteren Ileum vom Meerschweinchen in einem Gefäß eingespannt, das 5 ml einer von Sauerstoff durchperlten Tyrodelösung bei 37° C enthält. Die Kontraktionen werden mittels eines Stirnhebels aus Leichtmetall mit Glasspitze (Hebelübersetzung 1:5) auf der Trommel eines Rußkymographen aufgezeichnet. Die Einzelbestimmungen werden im Abstand von 2 min vorgenommen. Der Meerschweinchendarm wird nach jeder Zuckung ausgespült. Jede Probe wird in ver-

schiedener Reihenfolge und verschiedener Dosierung abwechselnd mit bestimmten Mengen einer Standardlösung dem Meerschweinchendarm angeboten. Zur biologischen Identifizierung des Histamins muß schließlich der Meerschweinchendarm mit einem Antihistaminikum, etwa Pyribenzamin in einer Dosis von 10^{-8} g, gegen Histamin blockiert werden. Die Zuckungshöhen werden an Hand einer log-Dosis-Wirkungs-Kurve im Vergleich zu den Kontraktionswerten nach Applikation der bekannten Histaminmengen ausgewertet. Der in gleicher Weise bestimmte Säulenleerwert ist jeweils abzuziehen. Zur Erzielung vergleichbarer Ergebnisse muß nach der oben angegebenen Methode jede Histaminbestimmung mindestens dreifach ausgeführt werden.

Für die Ausführung einer Einzelanalyse benötigt man durchschnittlich 7½ Stunden. Davon entfallen 2 Stunden auf die Extraktion nach McIntire aus dem Untersuchungsmaterial, 3 Stunden auf die Trennung an der Säule, 2 Stunden auf das zweite McIntiresche Extraktionsverfahren und ½ Stunde auf die Bestimmung am Meerschweinchendarm. Effektiv verringert sich der zeitliche Aufwand dadurch wesentlich, daß mit dem von McIntire entwickelten Verfahren größere Analysenserien gleichzeitig verarbeitet werden können. Schließlich kann durch Verwendung mehrerer Säulen die Arbeitszeit weiterhin verkürzt werden.

Ergebnisse

Nachdem wir in zahlreichen Versuchen festgestellt hatten, daß durch diese Methode eine exakte Trennung des Histamins von den genannten Stoffen gewährleistet ist, wurden von uns neben Histamin-Serotoningemischen in wäßriger Lösung 48 Serumeinzelproben aufgearbeitet, zu denen Histamin in Konzentrationen von 0,05–2,0 γ/ml Serum hinzugegeben war. Um die quantitative Leistungsfähigkeit der Methode zu prüfen, wurde 1. der Prozentsatz des rückgewonnenen Histamins, 2. die Fehlerbreite der Methode und 3. die geringste noch erfaßbare Histaminmenge bestimmt. Bei unseren Untersuchungen konnten bei exakter Einhaltung der Methodik im Mittel 74,7 % des zugesetzten Histamins bei den Substanzen, die direkt auf die Säule aufgetragen werden konnten, bzw. 50,8 % bei Notwendigkeit einer Extraktion des Histamins aus dem Untersuchungsmaterial mit dem McIntireschen Verfahren zurückgewonnen werden (Abb. 2). Der Prozentsatz lag bei Bestimmung hoher wie niedriger Konzentrationen in der gleichen Größenordnung. Der Verlust durch die Säule betrug im Mittel 10 %, wie wir in Kontrollversuchen feststellten. Die restlichen Verluste gehen zu 15 % bzw. 40 % zu Lasten des McIntireschen Extraktionsverfahrens. Die Standardabweichung der nach unserer Methode ermittelten Histaminwerte betrug bei Direktauftragung des Histamins auf die Säule $s = \pm 4{,}03$ % bzw. $s = \pm 5{,}31$ % bei zweimaliger Extraktion nach dem McIntireschen Verfahren. Als kleinste mit dieser Methode noch erfaßbare Histamindosis wurden 0,05 γ Histamin in der Einzelprobe festgestellt.

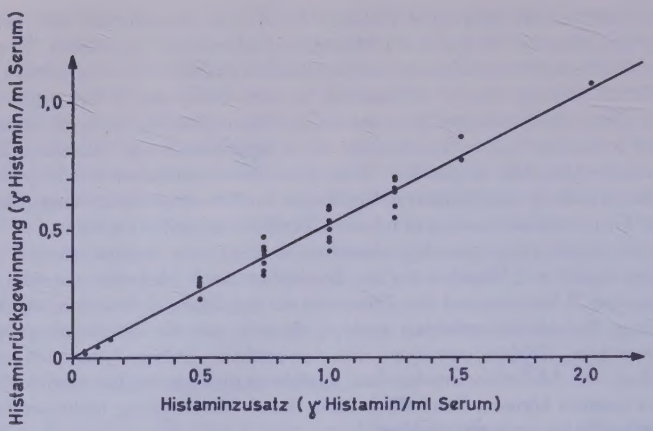

Abb. 2. In der graphischen Darstellung ist das Verhältnis des rückgewonnenen zum vorgegebenen Histamins quantitativ wiedergegeben. Dabei ist auf der Abszisse die Menge des zur Serumprobe zugesetzten Histamins und auf der Ordinate das nach Anwendung des von uns entwickelten säulenchromatographischen Verfahrens rückgewonnenen Histamins jeweils in γ Histamin/ml Serum aufgetragen. Aus der Abbildung geht die geringe Streuung der Einzelwerte bei Einhaltung der Versuchsbedingungen hervor.

Um den Wert der Methode zu demonstrieren, wurde der Histamingehalt von thrombozytenreichem Kaninchenplasma und von Peritonealspülzellen der Ratte bestimmt.

Dazu wurden einem Kaninchen 50 ml Citratblut entnommen und das Plasma durch langsames Zentrifugieren gewonnen (8). Die Histaminextraktion aus dem thrombozytenreichen Plasma erfolgte nach dem Verfahren nach McIntire. Dieser Extrakt wurde teilweise direkt, zum anderen Teil nach Trennung nach dem von uns entwickelten säulenchromatographischen Verfahren dem Meerschweinchendarm zur Bestimmung angeboten. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Verlustes von 25% durch die Extraktion nach McIntire und des durchschnittlichen Verlustes von 50% durch das säulenchromatographische Verfahren ergab sich ein Gehalt von 1,59γ Histamin/ml Plasma bei Direktbestimmung nach der Extraktion bzw. 1,14γ Histamin/ml Plasma bei Bestimmung nach dem säulenchromatographischen Verfahren, also ein Mehrwert von 0,45γ Histamin/ml Plasma bei Direktbestimmung nach dem McIntireschen Verfahren gegenüber der Bestimmung nach Trennung an der Säule. Das bedeutet, daß 28,3% des mit Hilfe des McIntireschen Verfahrens direkt ermittelten Wertes nicht Histamin entsprechen.

In der gleichen Weise haben wir versucht, den Histamingehalt von Peritonealspülzellen der Ratte (13) mit und ohne säulenchromatographische Trennung zu bestimmen. Hierbei fanden sich nach Berücksichtigung der Verluste durch die Säule und die Extraktion nach McIntire keine signifikanten Unterschiede. Die parallel ausgeführte Serotoninbestimmung am Rattenuterus (18) ergab einen Serotoningehalt in dem aus den Peritonealzellen gewonnenen Extrakt von weniger als 5% des Histamingehaltes. Dieser geringe Serotoninanteil erklärt die Übereinstimmung der Ergebnisse mit und ohne säulenchromatographische Trennung.

Aus diesen Beispielen geht hervor, daß der Anwendungsbereich für die Histaminbestimmung nach dem säulenchromatographischen Verfahren insbesondere dort liegt, wo neben Histamin größere Mengen anderer biogener Amine, vor allem Serotonin, vorkommen.

Diskussion

Der Wert der hier mitgeteilten Methode liegt in erster Linie darin, daß sie eine exakte Trennung des Histamins von anderen am Meerschweinchendarm wirksamen Stoffen mit einer quantitativen Bestimmung des Histamingehaltes verbindet. Die Ergebnisse der Histaminbestimmung in thrombozytenreichem Plasma von Kaninchen zeigen, daß viele mit den bislang gebräuchlichen Methoden erzielte Histaminwerte zu hoch liegen und somit einer Überprüfung bedürfen. Aus den mitgeteilten Ergebnissen ist ersichtlich, daß das von uns entwickelte Verfahren den Anforderungen einer qualitativen und quantitativen Histaminbestimmung entspricht. Neben einer exakten Isolierung des Histamins gewährleistet es eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Empfindlichkeit der Methode ermöglicht eine einwandreie Bestimmung von Histamin in physiologischen Konzentrationen.

Bei der Wahl der Methodik gingen wir davon aus, daß die Säulenchromatographie das sicherste und eleganteste Verfahren zur Trennung von Aminosäuren bzw. Aminen ist (7, 14, 19). Auf die Vorteile der sehr empfindlichen Histaminbestimmung am Meerschweinchendarm gegenüber anderen, z. B. chemischen Methoden (10, 12, 16), ist in der Literatur mehrfach hingewiesen worden (1, 3, 4, 5, 14, 17). Schwierigkeiten ergeben sich bei dem beschriebenen Verfahren insbesondere dadurch, daß einerseits das Histamin in wäßriger Lösung und geeigneter Konzentration auf die Chromatographiesäule aufgetragen werden muß, was eine Extraktion aus dem Untersuchungsmaterial voraussetzt und daß andererseits vor der quantitativen Bestimmung am Meerschweinchendarm das durch die Säule isolierte Histamin aus der Pufferlösung in physiologisches Milieu übergeführt und angereichert werden muß. Beide Forderungen erfüllt das Verfahren nach McIntire (11); allerdings besitzt diese Methode eine Reihe von Fehlermöglichkeiten. Dabei spielen zunächst die Eigenschaften des Untersuchungsmaterials eine Rolle. So ist gelegentlich zu beobachten, daß nach Zugabe von n-Butanol ein nur schwer ausschüttelbares Gel entsteht. In solchen Fäl-

len ist für eine ausreichende Verdünnung des Untersuchungsmaterials zu sorgen. Die Bedeutung des Eiweißgehaltes des zu extrahierenden Materials geht auch daraus hervor, daß die Histaminausbeute bei Ausschüttelung aus Puffer durchschnittlich höher ist, als bei der aus Serum. Weiterhin ist auf eine gute Trennung der wäßrigen und der Butanolphase zu achten, da mit dem Butanol auf die McIntireschen Chromatographieröhrchen aufgetragene Wassertropfen die Ergebnisse beeinflussen. Von großer Bedeutung ist vor allem der Grad der Veresterung der Baumwolle mit Bernsteinsäure. Hierbei spielt die Qualität der Baumwolle eine Rolle. So konnte mit einer Baumwolle, die wir in früheren Versuchen verestert hatten, bei zweimaligem Ausschütteln eine Histaminrückgewinnung von ca. 9% erzielt werden, wohingegen der für die hier mitgeteilten Versuche verwendete Baumwollester unter den gleichen Bedingungen eine Histaminausbeute von durchschnittlich 77,6% ergab. Wir fanden, daß unter den gleichen Versuchsbedingungen die Histaminausbeute bei unterschiedlichen absoluten Histaminmengen prozentual in der gleichen Größenordnung lag. Um den jeweiligen Verlust bei der McIntireschen Extraktionsmethode bestimmen zu können, empfiehlt es sich daher, Kontrollversuche mit Zusätzen bekannter Histaminmengen auszuführen. Bei Ausschluß der aufgeführten Fehlermöglichkeiten muß insgesamt festgestellt werden, daß das Extraktionsverfahren nach McIntire bei exakter Einhaltung der Versuchsbedingungen gut reproduzierbare Werte liefert.

Zusammenfassung

Es wird ein kombiniertes säulenchromatographisches und biologisches Verfahren zur Histaminbestimmung beschrieben, das einerseits eine exakte Isolierung des Histamins von anderen biogenen Aminen, andererseits eine einwandfreie quantitative Erfassung des Histamingehaltes zuläßt. Der Anwendungsbereich der Methode liegt insbesondere bei einem Untersuchungsmaterial, in dem neben Histamin größere Mengen anderer Stoffe, die am Meerschweinchendarm wirksam werden, vor allem Serotonin, Acetylcholin und Bradykinin, zu erwarten sind. An Hand eines Beispieles wird erläutert, daß die mit den bislang gebräuchlichen Histaminbestimmungsmethoden ermittelten Histaminwerte vielfach zu hoch liegen und einer Überprüfung bedürfen.

Summary

In the preceding report a combined column chromatographic and biological method for the estimation of histamine is described which on the one hand permits an exact isolation of histamine, on the other hand an accurate quantitative determination of the content of histamine. The range of application for this method extends on materials in which, besides histamine, larger quantities of other substances causing a reaction of the guinea-pig ileum are to be expected; these substances are mainly 5-hydroxytryptamine, acetylcholin and bradykinin. By means of an example it is illustrated that the data found by the methods for the determination of histamine which are in use in many cases are too high and need checking.

Literatur

1. Barsoum, G. S. and Gaddum, J. H.: The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood. J. Physiol., Lond. *85:* 1 (1935).
2. Burn, J. H.; Finney, D. J. and Goodwin, L. G.: Biological standardization, 2nd ed., p. 75 (Oxford Univ. Press, London 1950).
3. Code, C. F.: The quantitative estimation of histamine in blood. J. Physiol., Lond. *89:* 257 (1937).
4. Code, C. F.: Histamine in blood. Physiol. Rev. *32:* 47 (1952).
5. Gesler, R. M. and Matsuba, M.: An experimental design for the biological assay of histamine using the guinea-pig ileum. J. Pharm. exp. Ther. *114:* 151 (1955).
6. Guggenheim, M. und Löffler, W.: Biologischer Nachweis proteinogener Amine in Organextrakten und Körperflüssigkeiten. Biochem. Z. *72:* 303 (1916).
7. Hannig, K.: Erfahrungen mit der quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen und automatischer Registrierung der Ergebnisse. Clin. Chim. Acta. *4:* 51 (1959).
8. Hardisty, R. M. and Stacey, R. S.: 5-hydroxytryptamine in normal human platelets. J. Physiol., Lond. *130:* 711 (1955).
9. Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse; Bd. III/2, p. 1081 (Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1955).
10. Lubschez, R.: Chemical determination of histamine in human blood. J. biol. Chem. *183:* 731 (1950).
11. McIntire, F. C.; Roth, L. W. and Shaw, J. L.: The purification of histamine for bioassay. J. biol. Chem. *170:* 537 (1947).
12. McIntire, F. C.; White, F. B. and Sproull, M.: The determination of histamine with 2,4-dinotrofluorobenzene. Arch. Biochem. *29:* 376 (1950).
13. Padawer, J. and Gordon, A. S.: Isolation of mast cells from other cellular elements of rat peritoneal fluid. Proc. Soc. exp. Biol., N. Y. *88:* 29 (1955).
14. Roberts, M. and Adam, H. M.: New methods for the quantitative estimation of free and conjugated histamine in body fluids. Brit. J. Pharm. *5:* 526 (1950).
15. Rocha e Silva, M.; Beraldo, K. T. and Rosenfeld, G.: Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor releast from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. Amer. J. Physiol. *156:* 261 (1949).

16. Rosenthal, S. M. and Tabor, H.: An improved colorimetric method for the estimation of histamine. J. Pharm. exp. Ther. *92:* 425 (1948).
17. Schild, H. O.: A method of conducting a biological assay on a preparation giving repeated graded responses illustrated by the estimation of histamine. J. Physiol., Lond. *101:* 115 (1942/43).
18. Schmid, E.; Scheiffarth, F.; Zicha, L. und Siede, H.: Untersuchungen über die Rolle des 5-Hydroxytryptamin bei allergischen und rheumatischen Erkrankungen sowie über die Beeinflußbarkeit des Blutserotoninspiegels durch ACTH und Glucocorticoide. Z. ges. exp. Med. *133:* 1 (1960).
19. Warnatz, H.; Scheiffarth, F.; Schmid, E. und Zicha, L.: Untersuchungen zur Trennbarkeit und quantitativen Bestimmung von Histamin- und Serotoningemischen. Med. exp. *3:* 101 (1960).

Adresse der Autoren: Dr. H. Warnatz, Prof. Dr. F. Scheiffarth und Dr. M. Schulz, Medizinische Univ.-Klinik, Krankenhausstr. 12, *852 Erlangen* (Deutschland).

Lebenslauf

Als erster Sohn des damaligen Dentisten und jetzigen Zahnarztes Otto Schulz und seiner Ehefrau Martha, geb. Wohlmacher, wurde ich am 28. Juni 1937 in Bamberg geboren. Nach vier Jahren Volksschulbesuch in Ermershausen in Unterfranken wurde ich im Jahre 1947 in die Oberrealschule in Fürth/Bay. aufgenommen, an der ich im Sommer 1956 die Reifeprüfung ablegte. Drei Jahre vor dem Abitur siedelten meine Eltern von Ermershausen nach Sulzdorf a. d. Lederhecke über. Im Wintersemester 1956/57 begann ich in Erlangen das Studium der Zahnmedizin, wechselte im Wintersemester 1957/58 zum Studium der Medizin über und bestand im Februar 1960 die ärztliche Vorprüfung.
Das medizinische Staatsexamen habe ich am 19. Februar 1964 erfolgreich abgeschlossen.